［製造・販売元］

東洋紡績株式会社

ー納期・注文に関するお問い合わせー

バイオ事業部（大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833

バイオ事業部（東京）
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間：9:00～12:00 13:00～17:00（土、日、祝を除く）
e-mail: techosk@bio.toyobo.co.jp

［URL］http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr

JM109
COMPETENT high

Competent Cell Kit Code No. DNA-900

取扱説明書

(1) キットの内容

Competent Cell	100μl ×10本
pBR 322 DNA(1 pg/μl)	50μl × 1 本
SOC medium	1 ml ×10本

(2) 品質

形質転換効率　1 pgのpBR 322で形質転換した場合
5×10^{8} transformants/μg・pBR 322（液体窒素保存）
＊－80℃保存では10^{7}オーダーになります。

F保持率　＞99％

(3) 保存方法

－80℃，液体窒素

(4) Genotype

recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96
relA1 thi △(lac-proAB)
F′ [traD36 $proAB^{+}$ $lacI^{q}$ lacZ △M15]

(5) 形質転換方法

①Competent Cellを融解して、Falconチューブ(2059)に100μl移す。
②形質転換するDNAを加える。
③氷中に30分間放置する。
④42℃のヒートショックを30秒間行う。
⑤氷中で2分間冷却する。
⑥SOC mediumを900μl加え、37℃で1時間振とう培養する。
⑦LB/Ampプレートに適量まく。
⑧37℃で一晩培養する。

SOC medium	2%	Bacto tryptone
	0.5%	Bacto yeast extract
	10mM	NaCl
	2.5mM	KCl

上記組成の培地をオートクレーブ滅菌後、フィルターろ過したMg^{2+}ストック溶液と、別殺菌したグルコースストック溶液を、下の濃度になるよう加えている。　20mM $MgSO_4$, $MgCl_2$ (10mM each)
20mM Glucose

(6) 参考文献

Hanahan, D. J. Mol. Biol., 166, 557. (1983)

(7) 形質転換に関する特記事項

（以下の検討は、DH5, JM109, HB101等種々のコンピテントセルで行った。）

①DNA及びコンピテントセル量について

(1)加えるDNAの液量がコンピテントセル容量の25%に達すると効率は半減する。(Fig.1)
(2)DNAを10ng以上用いると、1μgDNAあたりのTransformant数は減少する。(Fig.2)
(3)プラスミドサイズが7.5Kb以上になると効率がかなり低下する。(Fig.3)
（使用plasmidの分子数が同数となるようにして形質転換を行った。）
(4)コンピテントセル使用量が50～200μlの範囲では効率は変わらないが、10μlで半減、400μlで倍増する。(Fig.4)

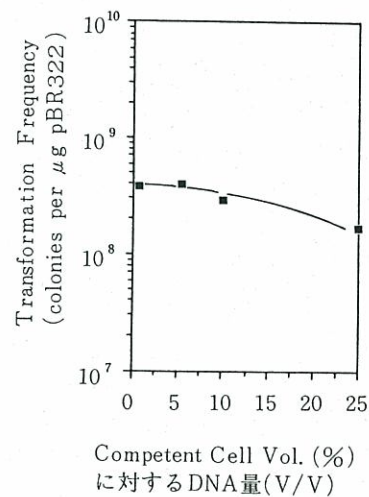
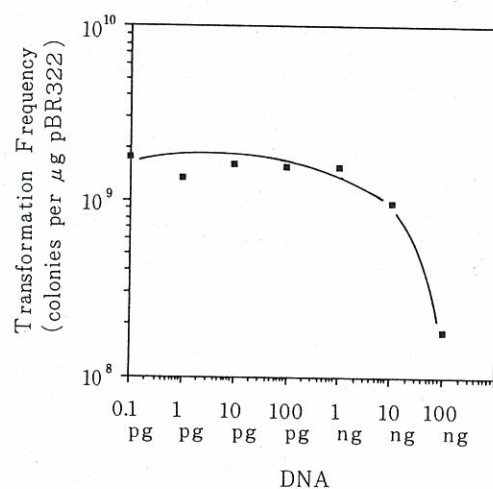
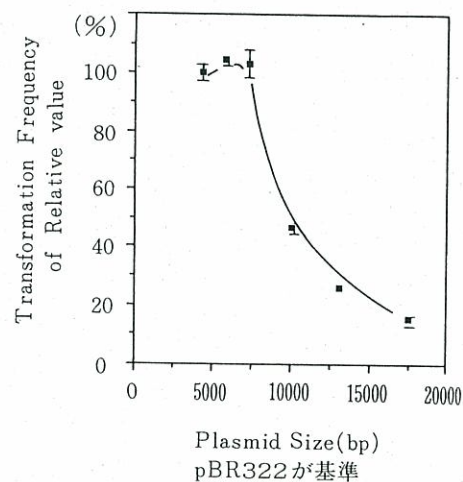
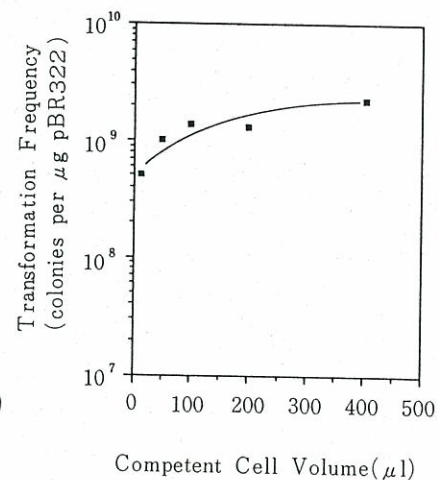
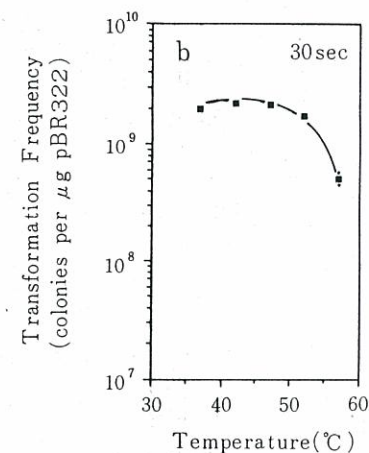
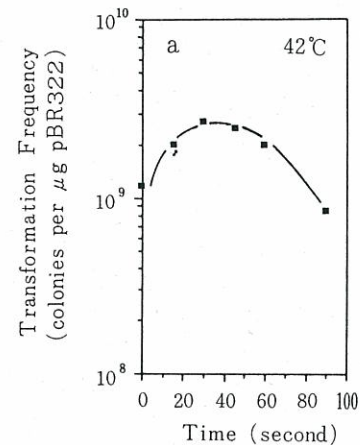
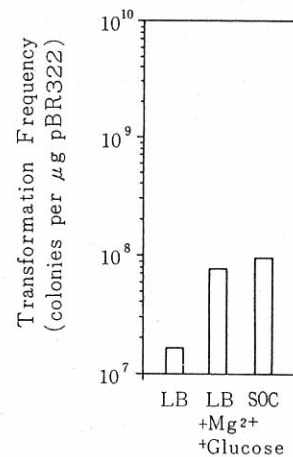
②ヒートショックについて

(1)DNAをコンピテントセルに添加してからヒートショックを行うまでの時間が15～60分間のとき形質転換効率に影響しない。
(2) 42℃ヒートの場合、ヒート時間は15～60秒が適している。また30秒ヒートの場合、35～52℃の間でヒートすればよい。(Fig.5)

③ヒートショック後の培養について

(1)LB培地に比べSOC培地を用いたときは、効率が5倍上がる。(Fig.6)
(2)培養時間や培養時の振とう数は効率に影響しない。

④形質転換効率の安定性について

(1)一度融解したコンピテントセルを再凍結すると、効率は1/4～1/10に低下する。(Table 1)

(Table 1)

保存 ＼ 凍結	液体 N_2	−80℃
液体 N_2	27%	—
−80℃	10%	8.3%

再凍結前のコンピテントセルの形質転換効率を 100%とし、上記条件で1ヵ月保存後の形質転換効率を調べた。
（ — は未実施）